



<p>(51) 国際特許分類 A61K 38/18, 47/26</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/33514</p> <p>(43) 国際公開日 1998年8月6日 (06.08.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00371</p> <p>(22) 国際出願日 1998年1月29日 (29.01.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/16349 1997年1月30日 (30.01.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社 (HOECHST MARION ROUSSEL LTD.) [JP/JP] 〒107 東京都港区赤坂二丁目17番51号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 稲垣実津子 (INAGAKI, Mitsuko) [JP/JP] 〒358 埼玉県入間市下藤沢1084番地1, B-312 Saitama, (JP) 市川秀樹 (ICHIKAWA, Hideki) [JP/JP] 〒350-11 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社 開発研究所内 Saitama, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 高木千嘉, 外 (TAKAGI, Chiyoshi et al.) 〒102 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: FREEZE-DRIED COMPOSITION OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN HUMAN MP52</p> <p>(54) 発明の名称 骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥組成物</p> <p>(57) Abstract A stable freeze-dried composition of a bone morphogenetic protein human MP52 wherein coloration and shrinking of MP52 during storage and aggregation at the re-dissolution can be prevented. The composition is obtained by mixing MP52 with mannitol at a weight ratio of 1 : 5 to 1 : 50 followed by freeze-drying.</p>		

(57) 要約

骨誘導因子ヒトMP52とマンニトールとを1:5~50(重量比)で混合した後凍結乾燥することにより、骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥品の保存時における着色、萎縮を防止し、再溶解時の凝集を防止した安定な骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥組成物が得られる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	英国	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	タンザニア
BB	バハマ	GH	ガーナ	MD	モルドバ	TM	トルクメニスタン
BE	ベルギー	GM	ギニア	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GN	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	US	米国
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UZ	ウズベキスタン
CC	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MW	モザンビーク	VN	ベトナム
CH	スイス	IT	イタリア	MX	メキシコ	YU	ユーゴスラヴィア
CM	コンゴ	JP	日本	NE	ニジェール	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KE	ケニア	NL	オランダ		
CU	キューバ	KR	韓国	NO	ノルウェー		
CY	キプロス	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド		
DE	ドイツ	KG	キルギス	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
EE	エストニア	RR	ロシア	RO	ルーマニア		
ES	スペイン	LC	セントルシア	RS	セルビア		
		LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
		LR	リベリア	SG	シンガポール		
		LS	レソト	SK	スロバキア		
				SL	シエラレオネ		

明 細 書

骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥組成物

技術分野

本発明は、骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥組成物およびその製法に関する。さらに詳しくは、本発明は骨誘導因子ヒトMP52とマンニトールとの混合物からなる骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥組成物およびその製法に関する。

背景技術

骨誘導因子ヒトMP52はTGF- β スーパーファミリーに属する骨形成関連因子として1994年にそのcDNAが初めて単離された(Biochem. Biophys. Res. Comm., Vol. 204, No. 2, 1994)。続いて遺伝子組換え技術により骨誘導活性を失うことなく骨誘導因子ヒトMP52が得られた(W096/33215)。骨誘導因子ヒトMP52は凍結乾燥して保存されるが、保存中にその体積が減少(萎縮)し、再溶解時に粉末が凝集するという問題がある。

このような問題を解決するために、同じTGF- β スーパーファミリーに属する蛋白質であり、骨誘導因子ヒトMP52に最も近い性質を有するといわれるBMP-2においては、添加物としてアミノ酸、糖類または多価アルコールが用いられている(特表平6-508777)。そこで本発明者らは、これらの添加剤の骨誘導因子ヒトMP52への適用を試みたが上記問題を解決することはできなかった。即ち、アラニン、バリン、リジン等の中性または塩基性アミノ酸0.5~2.5%を骨誘導因子ヒトMP52に添加して凍結乾燥しても、再溶解時に凝集が認められた。蔗糖、デキストラン等の糖類0.5~1%を同様に添加し凍結乾燥すると、凍結乾燥品に淡黄緑色の着色および萎縮が認められ、また、多価アルコールであるソルビトール0.5~1%を同様に添加し凍結乾燥すると、凍結乾燥中に骨誘導因子ヒトMP52が溶解し、凍結乾燥品とすることができなかった。

発明の開示

本発明者らは、上記問題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、骨誘導

因子ヒトMP52にマンニトールを添加して凍結乾燥すると、凍結乾燥品の保存中における着色や萎縮が認められず、再溶解時における凝集がないことを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、骨誘導因子ヒトMP52とマンニトールとの混合物からなる骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥組成物よりなる。本発明の骨誘導因子ヒトMP52としては、W096/33215で開示されている遺伝子工学的的方法により製造された骨誘導因子ヒトMP52（以下rhMP52ということもある）が好適に使用される。マンニトールとしては日本薬局方にD-マンニトールとして規定されているものが好適に使用される。骨誘導因子ヒトMP52とマンニトールとの混合比は1：5～50（重量比）が好ましい。

本発明の組成物は、骨誘導因子ヒトMP52とマンニトールとの混合物溶液を常法にしたがって凍結乾燥することにより容易に製造される。詳しくは、骨誘導因子ヒトMP52精製物の塩酸溶液に所定量のマンニトールを加えて混合し、得られた混合物溶液を濾過した後、無菌バイアルに充填し、凍結乾燥することにより本発明の組成物が得られる。

本発明の組成物は、これを用時注射用蒸留水又は弱酸（pH3付近）、例えば塩酸溶液やクエン酸緩衝液等で溶解し治療上有効な量が患者に投与される。

本発明の組成物のマンニトールの好ましい配合量は安定性試験により決定した。安定性試験は日本薬局方第13局に従って作成した標準操作手順書の方法に従って行われ、試験開始時および3ヶ月後の外観の性状、溶状、電気泳動、水分含量及び6ヶ月保存後の異所性骨形成能を測定することにより行われた。

その結果、試験開始時および3ヶ月後外観において性状および溶状に変化はみられなかった。また、電気泳動の結果および水分含量の結果から、マンニトールを前記の重量比で含有する製剤はいずれも試験開始時と3ヶ月後の比較において安定であった。

凍結乾燥品の水分含量は一般的に2%以下が好ましいとされている。以上のことから骨誘導因子ヒトMP52、1mg当たりマンニトールを5～50mg、望ましくは10mg含有する骨誘導因子ヒトMP52組成物が医薬品原体として好ましいと判断された。

さらに、マンニトールを10、25、50mg添加した骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥組成物を6ヶ月保存した後の異所性骨形成能について測定した。その結果、保存温度及びマンニトール添加量に拘わらずいずれも骨形成が認められた。これらの試験結果から骨誘導因子ヒトMP52にマンニトールを配合して凍結乾燥した場合、骨誘導因子ヒトMP52には何らの悪影響を与えず、長期間にわたり安定であることが確認された。

発明を実施するための最良の形態

次に、実施例を示して本発明の効果を具体的に説明する。

実施例1 rhMP52組成物の調製

W096/33215で開示されている製造方法により得られたrhMP52精製物10mM塩酸溶液1mg/mlに日本薬局方のD-マンニトール10、25及び50mgを加えて混合し、混合物を濾過（0.22 μ mメンブランフィルター使用）後、濾液を無菌的に1mlずつバイアルに充填した。それらを凍結乾燥して医薬品原体形態の本発明の組成物を調製した。

実施例2 rhMP52組成物の安定性試験

実施例1で得られたrhMP52凍結乾燥組成物をバイアル瓶（気密、透明）容器に詰め、2～8℃、25℃及び40℃下にそれぞれ保存した。安定性の判定は、下記判定基準に基づいて3ヶ月間それぞれ保存後に評価した。判定基準は下記のとおりである。

性 状：

（外観）：試験時と同じく、白色のケーキであり、着色のみられないものを「変化なし」と判定した。

（溶状）：注射用蒸留水1mlにとかした溶液が、無色澄明であり、凝集

が認められないものを「変化なし」と判定した。

電気泳動：赤色フィルムを用いた透過によるフィルムスキャナーで画像を取り込み、各バンドのインテグレーション・オブチカル・デンシティ（Integration Optical Density：IOD）%を求め、面積百分率により主バンドの純度を算出した。

水分含量：微量水分計を用いてその水分含量を測定した。

結果は性状として、本発明の組成物は外観および溶状は変化なしであったが、rhMP52単独の凍結乾燥品では凝集が見られた。電気泳動における安定性(%)の結果はいずれも良好であった。

水分含有率(%)の結果を表1に示す。表1は水分含有率にはいずれも大きな変化がないことを示している。本発明組成物はrhMP52単独品に比較して製造時および保存後の水分含有率が低く、萎縮がおこりにくいことを示している。

表 1

	試験開始時	3 ヶ 月 後		
		2～8℃	25℃	40℃
rhMP52 単独	9.7	9.2	7.6	7.8
マンニトール10mg	1.6	1.6	1.4	1.2
” 25mg	0.9	0.7	0.6	0.5
” 50mg	0.6	0.5	0.4	0.4

実施例 3 rhMP52の異所性骨形成能

実施例1で得られたrhMP52組成物1バイアル（1mg／バイアル）を4℃および25℃でそれぞれ6ヶ月保存後、これらに注射用蒸留水1mlを加えて投与液を調製し、これらをICRマウス（日本クレア(株)より購入）に20μg／20μl筋注し、2週間後に骨形成の有無を軟X線撮影で観察した（n＝2）。その結果を表2に示す。

表 2

	4℃	25℃
rhMP52単独	骨形成有り	骨形成有り
マンニトール10mg	骨形成有り	骨形成有り
” 25mg	骨形成有り	骨形成有り
” 50mg	骨形成有り	骨形成有り

産業上の利用可能性

骨誘導因子ヒトMP52は凍結乾燥品が保存時に着色あるいは萎縮し、また再溶解時に凝集するという問題がある。しかるに本発明の凍結乾燥組成物においては、上記の問題点はみられない。本発明の凍結乾燥組成物中の骨誘導因子ヒトMP52は、長期保存しても安定であり、純度、水分含有率、異所性骨形成能においてほとんど変化はみられない。従って、本発明は医薬製造分野において利用可能である。

請 求 の 範 囲

1. 骨誘導因子ヒトMP52とマンニトールとの混合物からなる骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥組成物。
2. 前記骨誘導因子ヒトMP52とマンニトールの混合比が1 : 5～50（重量比）である請求項1に記載の凍結乾燥組成物。
3. 前記骨誘導因子ヒトMP52が遺伝子工学的的方法により産生されたものである請求項1または2に記載の凍結乾燥組成物。
4. 骨誘導因子ヒトMP52精製物溶液にマンニトールを加え、得られた混合物溶液を凍結乾燥することからなる骨誘導因子ヒトMP52凍結乾燥組成物の製造方法。
5. 前記骨誘導因子ヒトMP52とマンニトールの混合比が1 : 5～50（重量比）である請求項4に記載の凍結乾燥組成物の製造方法。
6. 前記骨誘導因子ヒトMP52が遺伝子工学的的方法により産生されたものである請求項4または5に記載の凍結乾燥組成物の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K38/18, A61K47/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K38/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 96/33215, A1 (Hoechst Japan Ltd.), October 24, 1996 (24. 10. 96) & AU, 9653470, A	1-6
A	JP, 7-503847, A (Biopharm Gesellschaft zur Biotechnologischen Entwicklung von PharmakambH.), April 27, 1995 (27. 04. 95) & WO, 93/16099, A2 & EP, 625989, A1	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
April 9, 1998 (09. 04. 98)Date of mailing of the international search report
April 21, 1998 (21. 04. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K38/18, A61K47/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K38/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 96/33215, A1 (ヘキストジャパン株式会社) 24. 10月. 1996 (24. 10. 96) & AU, 965 3470, A	1-6
A	JP, 7-503847, A (ビオファルム ゲゼルシャフト ツア ビオデヒノロ ギッシェン エントヴィックルング フォン ファル マカ ミット ベシュレンクテル ハフツング) 27. 4月. 1995 (27. 04. 95) & WO, 93/1609 9, A2 & EP, 625989, A1	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 04. 98

国際調査報告の発送日

21.04.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C

9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452